

На правах рукописи

ДАНИЛОВА ЮЛИЯ ВАСИЛЬЕВНА

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ БАЦИЛЛЯРНЫХ ПРОТЕИНАЗ

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2014

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой биологической и неорганической химии факультета биотехнологии и стандартизации ФГБОУ ВПО "Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана"
Алимов Азат Миргасимович.

кандидат биологических наук, в.н.с. лаборатории иммунологии и разработки аллергенов Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора
Куликов Сергей Николаевич

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «**Казанская государственная медицинская академия**», г. Казань

Защита диссертации состоится «12 февраля 2015 г. в 13.00 ч на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Карла Маркса, 74, аудитория 205.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан «___» декабря 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



З. И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В современном мире сердечнососудистые заболевания, а также болезнь Альцгеймера являются наиболее частыми причинами смерти. Лечение этих грозных заболеваний представляет одну из актуальных проблем медицины. Дефицит сырья животного происхождения и, как следствие, недоступность ферментных препаратов в необходимых количествах для медицинской практики, а также их высокая стоимость, стимулируют разработку новых терапевтических средств микробного происхождения.

Особое внимание исследователей привлекают белки и ферменты, обладающие фибринолитическими и тромболитическими свойствами (Kamiya et al., 2010). В настоящее время получили распространение препараты на основе микробных белков – стрептокиназы и стафилокиназы, которые обладают токсичностью и вызывают побочные эффекты при лечении (Kumar et al., 2013). Для медицинской практики перспективны бактериальные протеиназы, обладающие высокой стабильностью и низкой патогенностью. К таким относится препарат Тромбовазим на основе субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus subtilis*, обладающий высокой эффективностью и низкой токсичностью (Вышков с соавт., 2006). Это указывает на перспективность применения микробных протеиназ в качестве тромболитических средств. Открытие огромного количества бациллярных протеиназ, изучение механизмов экспрессии их генов и биохимических свойств оставляют немало вопросов относительно биологической активности этих ферментов. В связи с этим научный и практический интерес представляют исследования фибринолитических, тромболитических, антикоагулянтных свойств микробных протеиназ, выяснение их влияния на культуры клеток, а также тестирование по активности в отношении таких жизненно важных белков, как клеточные матриксные металлопротеиназы и бета-амилоид.

Степень разработанности темы исследования. В ходе предварительных экспериментальных работ в Казанском государственном университете были подробно охарактеризованы ферменты *B. pumilus* 7P – субтилизиноподобная протеиназа, глутамилэндопептидаза и металлопротеиназа. Гены протеиназ клонированы и секвенированы, их последовательности зарегистрированы в Международной базе данных (субтилизиноподобная протеиназа AN AY 754946, глутамилэндопептидаза AN Y15136, металлопротеиназа AN EU678894). Изучено действие стрессовых факторов на биосинтез ферментов, устройство, механизмы активации и особенности экспрессии их генов (Каюмов, 2006; Частухина с соавт. 2004, 2005; Черемин с соавт., 2010, 2014). Соответствующие белки были

выделены и очищены из культуральной жидкости (Михайлова с соавт., 2009; Балабан с соавт., 2003). Изучены каталитические, физико-химические и энзиматические свойства всех трех протеиназ (Михайлова с соавт., 2007; Шамсутдинов с соавт., 2008; Рудакова с соавт., 2010). Однако биологическая активность ферментов остается малоизученной. Эта задача решалась в ходе работы.

Цель и задачи исследований. Целью данной работы являлось исследование биологических эффектов бактериальных протеиназ *B. pumilus* 7P с различной специфичностью.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Получить внеклеточные протеиназы *B. pumilus* – глутамилэндопептидазу, субтилизиноподобную протеиназу и металлопротеиназу на основе рекомбинантных штаммов с высокой продуктивностью.
2. Исследовать тромболитическую и фибринолитическую активность протеиназ *B. pumilus*.
3. Определить действие бактериальных ферментов на матриксные металлопротеиназы (ММП-9) разных клеточных линий.
4. Провести анализ продуктов гидролиза бета-амилоида, вызывающего Болезнь Альцгеймера, бациллярными протеиназами.
5. Выяснить влияние бактериальных протеиназ на процесс инфицирования клеток человека *in vitro* аденовирусами.
6. Оценить токсические эффекты протеиназ на клетки бактерий и перевиваемые культуры клеток животных.

Научная новизна. Впервые получены данные о тромболитической и фибринолитической активности внеклеточных протеиназ *B. pumilus* с различной специфичностью. Дана оценка цитотоксичности протеиназ по отношению к клеточным культурам животных. Установлено действие бактериальных протеиназ с различной специфичностью на матриксные металлопротеиназы (ММП-9) фибробластов мыши (3T3Balb SV40), мезенхимных клеток (МСК) и клеток Hela-M. Изучены продукты расщепления протеиназами бета-амилоида, вызывающего болезнь Альцгеймера.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные по биологической активности бактериальных протеиназ с различной специфичностью вносят вклад в характеристику свойств этих ферментов. Данные по фибринолитической активности, полученные в работе, позволяют рассматривать протеиназы *B. pumilus* как перспективные тромболитические средства для лечения сердечнососудистых заболеваний. Способность глутамилэндопептидазы разрушать матриксные металлопротеиназы разных

клеточных линий может быть применена для создания препаратов при лечении атеросклероза. Активность протеиназ по отношению к бета-амилоиду делает их перспективными в создании лекарственных средств против болезни Альцгеймера.

Положения, выносимые на защиту:

1. Глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* 7P обладают тромболитической и фибринолитической активностью и могут быть использованы в терапии сердечнососудистых заболеваний.
2. Бактериальная глутамилэндопептидаза способна разрушать ММП-9 и перспективна для разработки средств, используемых при профилактике атеросклероза.
3. Бактериальные протеиназы гидролизуют бета-амилоид и являются потенциальными агентами для борьбы с болезнью Альцгеймера.
4. Протеиназы оказывают дозозависимый цитотоксический эффект на перевиваемые культуры клеток животных.

Степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается большим объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и анализированных на современных высокоточных приборах; опубликованием полученных данных в отечественных журналах, с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на международных и региональных конференциях: Научно-практическая конференция «Становление и достижения биохимической школы Казанского университета», КГУ, (Казань, 2009); Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «ЛОМОНОСОВ», МГУ, (Москва, 2010, 2011, 2013); XLVIII Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2010); Первая Всероссийская молодежная научная конференция, посвященная 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии» (Томск, 2010); X Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КФУ «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2011); Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011; Уфа, 2013); 86-ая Всероссийская студенческая научная конференция, памяти чл.-корр. Академии наук РТ, проф. И.Г. Салихова (Казань, 2012); Международная конференция «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012); Конгресс Федерации европейских биохимических обществ 2013 (FEBS) «Биологические механизмы» (Санкт-Петербург, 2013); 7-ая Всероссийская конференция «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014); IV

Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014).

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности «Казанского (Приволжского) федерального университета» среди ведущих мировых научно-исследовательских центров, а также, частично, за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Исследования выполнены при поддержке грантов: РФФИ 09-04-99044-р-офи, 14-34-50792-мол_нр; Федеральной целевой программы «Научные и научно - педагогические кадры инновационной России»: ГК № ПЗ23, № ПЗ44, № П406, № П1053, № 14.А18.21.0575, № 14.А18.21.1516, №14.А18.21.0849.

Личный вклад автора заключается в разработке основной проблемы исследования, планировании, организации и реализации ее экспериментального решения, интерпретации полученных результатов.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 10 научных работ в реферируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

Общая структура диссертации. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и список литературы. Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 33 рисунка. Библиография содержит 184 наименований российских и зарубежных авторов.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., профессору кафедры микробиологии М.Р. Шариповой за постановку проблемы, внимательное отношение к работе и обсуждение полученных результатов; к.б.н., с.н.с. Н.П. Балабан и к.б.н. доц. А.М. Мардановой за постоянные консультации и обсуждение результатов; А.А. Ризванову за возможность исследования противовирусной активности протеиназ в лаборатории культуры тканей КФУ; профессору Г.Н. Руденской за возможность проведения части экспериментов в лаборатории Химии природных соединений химического факультета МГУ (Москва); кбн, снс Л.В. Лютовой (Биологический факультет МГУ) за помощь в работе с тромбоэластографом; С.Ю. Хайтиной за возможность проведения зимографии в Институте Цитологии РАН (Санкт-Петербург); профессору Гюнтеру Лохниту (г. Гиссен, Германия) за проведение MALDI-TOF масс-спектрометрии; кбн, Ю.М.Кирилловой за помощь и консультации в проведении экспериментов с клеточными линиями; кбн И.И. Салафутдинову за помощь в постановке МТТ-теста; А.Б. Маргулис за помощь в проведении микроядерного теста. Автор выражает искреннюю благодарность

заведующей кафедрой микробиологии Казанского федерального университета д.б.н., профессору, академику АН РТ О.Н. Ильинской и всем сотрудникам кафедры за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и плазмиды. В работе использовали штаммы из музея лаборатории Биосинтеза и Биоинженерии Ферментов КФУ: *B. pumilus* 7P – дикий тип, рекомбинантные штаммы *B. subtilis* JB 20-36 (предоставлен для работы проф. Е. Феррари, Genencor Int. Inc., США), *B. subtilis* SMR 50 (pTN12), *B. subtilis* SMR 51 (pTN13), *B. subtilis* SMR 52 (pTN14), генотип штаммов представлен в таблице 1. Штамм-реципиент *B. subtilis* BRB08, дефектный по генам восьми внеклеточных протеиназ, получен из коллекции Cobra Biologics, Великобритания. Плазмида pGP382 предоставлена профессором Т. Mascher (Мюнхенский университет Людвига-Максимилиана, г. Мюнхен, Германия) (Рисунок 1) (Herzberg et al., 2007).

Таблица 1.

Генотип использованных в работе рекомбинантных штаммов бацилл

Штамм-реципиент (генотип)	Исходный вектор (генотип)	Клонированный в вектор ген	Полученный рекомбинантный вектор	Полученный рекомбинантный штамм
<i>B. subtilis</i> BRB08 ($\Delta nprB$, $\Delta aprE$, Δepr , Δbpr , $\Delta nprE$, Δmpr , Δvpr , $\Delta wprA$)	pGP382 (<i>bla</i> , <i>erm</i> , <i>P_{degQ36}</i> , N терминальный Strep)	<i>aprBp B. pumilus</i> 7P (1158 п.о.)	pNT12	<i>B. subtilis</i> MRS50
		<i>gseBp B. pumilus</i> 7P (924 п.о.)	pNT13	<i>B. subtilis</i> MRS51
		<i>mprBp B. pumilus</i> 7P (825 п.о.)	pNT14	<i>B. subtilis</i> MRS52

Условия культивирования бактериальных штаммов. Для культивирования бактерий использовали среду LB (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH 8.5 (Sambrook et al., 1989). Рост бактерий отслеживали по изменению оптической плотности культуры на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при $\lambda=590$ нм. Количество биомассы выражали в единицах оптической плотности.

Стерилизацию сред проводили при 1 атм. в течение 30 мин. Перед стерилизацией среды доводили pH 40%-ным раствором NaOH до значения pH 8.5. В среду добавляли эритромицин до конечной концентрации 20 мкг/мл.

Микроскопирование бактерий проводили с помощью микроскопа MICROS AUSTRIA MC 300 при различных увеличениях.

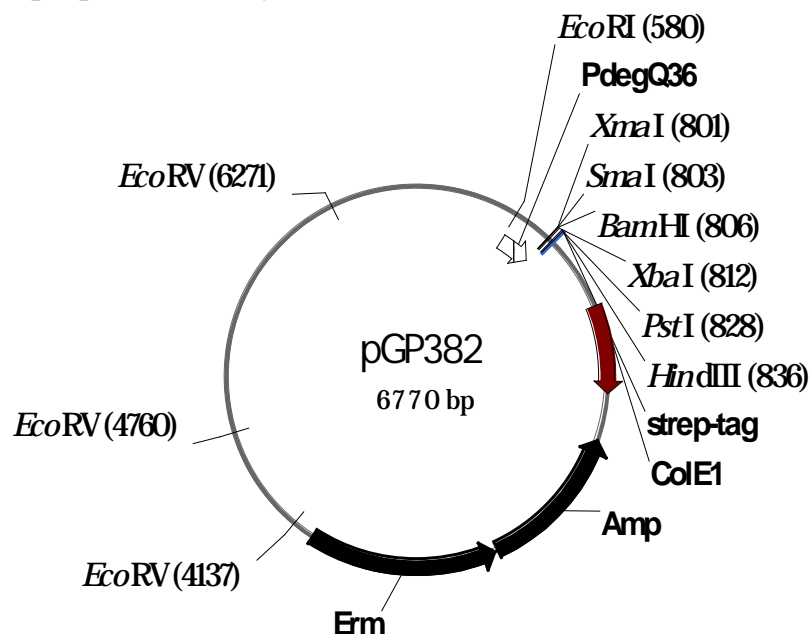


Рисунок 1. Схема плазмидного вектора pGP382 для клонирования генов *aprBp*, *gseBp* и *mprBp* со strep-tag-последовательностями на С-конце. Клонирование генов протеиназ в вектор проводили по сайтам рестрикции BamHI и HindIII.

Определение протеолитической активности. Протеолитическую активность металлопротеиназы (MprBp) определяли по расщеплению азоказеина (Sigma, США) (Рудакова с соавт., 2010). Специфическую активность субтилизиноподобной протеазы (AprBp) определяли по расщеплению хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa, а глутамилэндопептидазы (GseBp) по расщеплению хромогенного субстрата Z-Glu-pNa по методу Люблинской и др. (Люблинская с соавт., 1987). За единицу активности принимали количество фермента, в условиях эксперимента гидролизующего 1 мкМ субстрата за 1 мин. Продуктивность культуры в отношении синтеза протеолитических ферментов определяли как отношение величины протеолитической активности к величине биомассы и выражали в % или в усл. ед. Удельную активность фермента определяли как отношение протеолитической активности к единице белка и выражали в ед/мг белка.

Выделение и очистка протеиназ. Для выделения субтилизиноподобной протеиназы (AprBp), глутамилэндопептидазы (GseBp) и металлопротеиназы (MprBp) соответствующие рекомбинантные штаммы *B. subtilis* MRS 50, *B. subtilis* MRS 51, *B. subtilis* MRS 52, выращивали в объеме 100 мл на среде LB в течение 22 (MRS 51) и 26 (MRS 50, MRS 52) часов. В качестве инокулята использовали 16-ти часовую культуру, которую вносили в среду культивирования в количестве 1%

(v/v). 100 мл культуральной жидкости освобождали от клеток центрифугированием в течение 20 мин при 13 000 об/мин. Очистку белков проводили с помощью аффинной хроматографии с использованием хроматографического сорбента стреп-тактин сефарозы (модифицированный стрептовидин) (Qiagen, Германия).

Степень чистоты полученных белковых препаратов и их молекулярную массу определяли электрофоретически. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях по методу Лаэммли (Laemmli, 1970) и в нативных условиях в 10% ПААГ, как описано на сайте (http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/PAGE_Acidic.html).

Для определения тромболитических свойств протеиназ *in vitro* были получены фибриновые сгустки. К сгусткам добавляли по 0.1 мл раствора препарата фермента (в концентрациях 0.2 и 0.4 мг/мл) и помещали в водяной термостат (в контрольные пробирки добавляли 0.145 М NaCl). Отмечали время полного лизиса сгустков.

Определение активности плазминогена под действием протеиназ. Активность плазминогена определяли по расщеплению синтетического хромогенного субстрата D-Val-Ley-Lis-pNa спектрофотометрически при длине волны $\lambda=280$. Каждый из ферментов смешивали с раствором плазминогена («Sigma») в соотношении 1:20, добавляли 20 мкл субстрата. Активность плазминогена измеряли каждые 30 мин. при 37°C.

Способность белков предотвращать образование фибриновых сгустков исследовали с помощью тромбоэластографа ("Hellige", Австрия) по методике Хартерта (Hartert, Klin. Wochenschr, 1948).

Действие протеиназ на фибриновые пластины. Активность протеиназ по отношению к фибриновым пластинкам определяли по методу Аструпа (Astrup *et al.*, 1952). За фибринолитическую активность ферментов принимали зону лизиса на прогретой пластине.

Гидролиз фибриногена под действием протеиназ. Для определения продуктов гидролиза фибриногена быка использовали раствор фибриногена в ацетате аммония (0.05 М, pH 7.8) с концентрацией 4мг/мл. К этому раствору добавили каждый из исследуемых ферментов в соотношении 1:20 (в концентрации 0.4 мг/мл). Продукты гидролиза фибриногена протеиназами разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лаэммли (Laemmli, 1970), а затем идентифицировали с помощью MALDI масс-спектрометрии триптических гидролизатов (<http://www.biochem.unitzh.ch/services/protocol/ingeldigestion.pdf>).

Действие бациллярных ферментов на матриксную металлопротеиназу-9 (желатиназу-B). С помощью метода зимографии исследовали способность протеиназ расщеплять матриксную металлопротеазу ММП-9. Источниками металлопротеазы ММП-9 служили кондиционированные среды фибробластов мыши (3T3Balb SV40), мезенхимных клеток (МСК) и клеток Hela-M.

Расщепление β -амилоидного пептида бактериальными протеиназами проводили *in vitro* по методу (Люблинская, Биоорг.химия, 1982). Порошок β -амилоида («GenScript», США) растворяли в дистиллированной воде до конечной концентрации 0.2 мг/мл. Продукты гидролиза β -амилоида бактериальными протеиназами идентифицировали на масс-спектрометре Vision 2000 TOF («ThermoBioanalysis», Великобритания). Данные обрабатывали с помощью программ Peptide Mass Fingerprint (<http://www.matrixscience.com>) и Peptide Mass (<http://cn.expasy.org>).

Изучение влияния бактериальных протеиназ на инфицирование клеток культуры ткани аденовирусом. Клетки HEK293A высевали в 24-луночный планшет из расчета 30 тыс. клеток на лунку. Через 24 ч добавляли смесь ферментов и рекомбинантного аденовируса Ad-EGFP (предоставлен для работы А.А. Ризвановым, КФУ). Перед добавлением к культуре клеток проводили инкубацию каждой протеиназы (в концентрациях 0.1, 0.2 и 0.4 мг/мл) с рекомбинантным аденовирусом Ad-EGFP (в концентрациях 10^3 и 10^4 БОЕ/мкл) в течение часа.

Анализ экспрессии зеленого флуоресцентного белка проводили с помощью флуоресцентной микроскопии на инвертированном флуоресцентном микроскопе исследовательского класса AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия), а также с помощью проточной цитометрии на цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT (Millipore, С.Ш.А.).

Определение токсического действия протеиназ на клетки эукариот. Цитотоксическое действие микробных протеиназ изучали на перевиваемых линиях клеток животных: ЛЭК (легкие эмбриона коровы), Vero (почки африканской зеленой марышки), PK-15 (почки свиньи) и НГУК (невринома Гассерова узла крысы). Клеточные линии получили из базы ATCC (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>). Культивирование клеток проводили по стандартной методике (Адамс, 1983) на среде Игла MEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. Ферменты в концентрации 0.01; 0.1; 0.2 и 0.4 мг/мл добавляли в лунки с клеточным монослоем. Контролем служили лунки с раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия) без добавления протеиназы. Цитотоксическое действие протеиназ изучали по изменению морфологии клеток, клеточного монослоя и жизнеспособности клеток. Изменения морфологии клеток

и клеточного монослоя до и после обработки протеиназой оценивали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Япония) по следующим параметрам: адгезия и распластывание клеток, изменение конфигурации клеток, наличие вакуолизации, изменение общей архитектуры клеточного монослоя. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста (Riss et al., 2013).

Математическая обработка результатов. Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение и очистка протеиназ *B. pumilus* 7P из рекомбинантных штаммов *B. subtilis*. Исследования проводили с внеклеточными протеиназами *B. pumilus* 7P, отличающимися по специфичности гидролиза субстрата. Две из них сериновые протеиназы, субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза, первая преимущественно расщепляет пептидные связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислотных остатков Phe, Tyr, Leu, а также способна расщеплять связи, образованные аминокислотными остатками гидрофильных аминокислот Ser, Cys, Asn, Gln (Itskovich et al., 1997; Михайлова с соавт., 2007). Глутамилэндопептидаза, является высокоспецифичным ферментом и расщепляет пептидные связи, образованные α -карбоксильными группами глутаминовой, аспарагиновой, а также цистеиновой кислот (Leshchinskaya et al., 1997).

В отличие от сериновых протеиназ металлопротеиназа *B. pumilus* 7P классифицируется как адамализиноподобная металлоэндопептидаза класса метцинкинов и проявляет более широкую субстратную специфичность (Рудакова с соавт., 2010). Фермент является цинкзависимым и не проявляет предпочтения к определенным аминокислотным остаткам расщепляемой пептидной связи.

Для получения протеиназ в количествах, достаточных для изучения биологических свойств получали рекомбинантные штаммы с повышенным выходом каждого из ферментов. После трансформации плазмид pTN12, pTN13, pTN14, несущих гены субтилизиноподобной протеиназы, глутамилэндопептидазы и адамализиноподобной металлопротеиназы *B. pumilus* 7P под сильным конститутивным промотором P_{degQ36} в протеазо-дефицитный штамм *B. subtilis* BRB08 получили рекомбинантные штаммы *B. subtilis* MRS 50, *B. subtilis* MRS 51 и *B. subtilis* MRS 52, соответственно. Изучали экспрессию генов протеиназ в рекомбинантных штаммах, которые выращивали на среде LB в течение 24-30 ч (Рисунок 2-4).

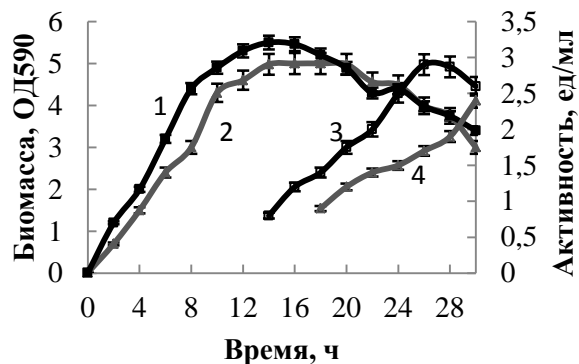


Рисунок 2. Динамика роста и протеолитическая активность субтилизиноподобной протеиназы (ед/мл в мин) рекомбинантных штаммов *B. subtilis*. 1 – Рост культуры рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 2036 (pCS9); 2 – Рост культуры рекомбинантного штамма *B. subtilis* MRS50 (pTN12); 3 - активность субтилизиноподобной протеиназы под контролем промотора P_{degQ36} , 4 – активность субтилизиноподобной протеиназы под контролем собственного промотора.

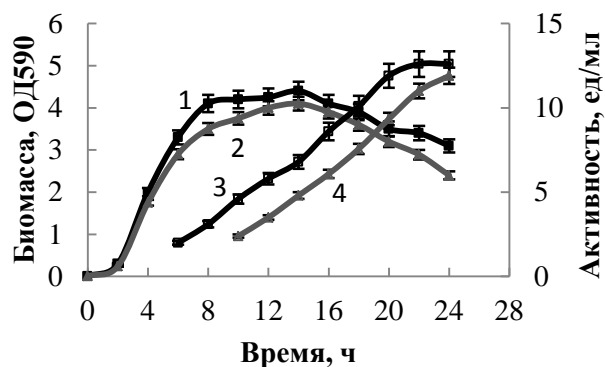


Рисунок 3. Динамика роста и протеолитическая активность глутамилэндопептидазы (ед/мл в мин) рекомбинантных штаммов *B. subtilis*. 1 – Рост культуры рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 2036 ($\Delta 58.21$); 2 – Рост культуры рекомбинантного штамма *B. subtilis* MRS51 (pTN13); 3 - активность глутамилэндопептидазы под контролем промотора P_{degQ36} , 4 – активность глутамилэндопептидазы под контролем собственного промотора.

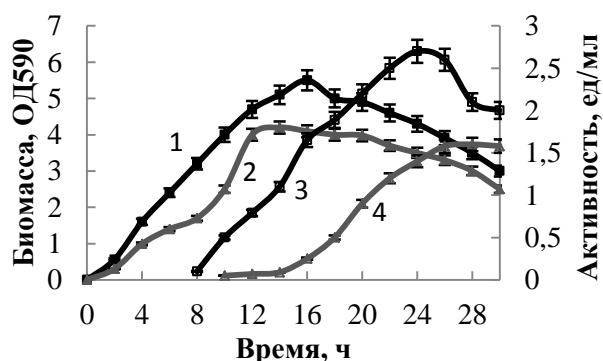


Рисунок 4. Динамика роста и протеолитическая активность металлопротеиназы (ед/мл в мин) рекомбинантных штаммов *B. subtilis*. 1 – Рост культуры рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 2036 (pSA1); 2 – Рост культуры рекомбинантного штамма *B. subtilis* MRS52 (pTN14); 3 - активность металлопротеиназы под контролем промотора P_{degQ36} , 4 – активность металлопротеиназы под контролем собственного промотора.

Протеолитическая активность субтилизиноподобной протеиназы (Рисунок 2) и глутамилэндопептидазы (Рисунок 3) в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов была в 1.5 раза выше по сравнению со штаммами, у которых гены бактериальных протеиназ находились под контролем собственных промоторов - *B. subtilis* (pCS9) и *B. subtilis* (Δ 58.21). Протеолитическая активность металлопротеиназы рекомбинантного штамма была в 2 раза выше, чем у штамма *B. subtilis* (pSA1), в котором ген металлопротеиназы находился под контролем собственного промотора (Рисунок 4). Активность ферментов в рекомбинантных штаммах появлялась в среднем на четыре часа раньше, что вызвано заменой собственных промоторов генов на гетерологичный конститутивный промотор P_{degQ36} . Таким образом, для выделения и очистки ферментов, полученных на основе вектора pGP382, рекомбинантные штаммы, содержащие гены субтилизиноподобной протеиназы и металлоэндопептидазы, выращивали до 26 часа роста, а культуру с геном глутамилэндопептидазы до 22 часа роста. Далее протеиназы выделяли из 100 мл культуральной жидкости. Хроматография на стреп-тактин сефарозе концентратов протеиназ (600-700 мкл) позволила провести эффективную очистку. За одну стадию глутамилэндопептидаза получена со степенью очистки 348 и выходом по активности 63.5%.

Степень очистки и выход субтилизиноподобной протеиназы составили 306.3 и 60.8%, соответственно. Металлопротеиназа получена со степенью очистки 362.5 и выходом по активности 70.3%. Молекулярные массы очищенных белков составили 23, 27 и 19 кДа, соответственно (Рисунок 5).

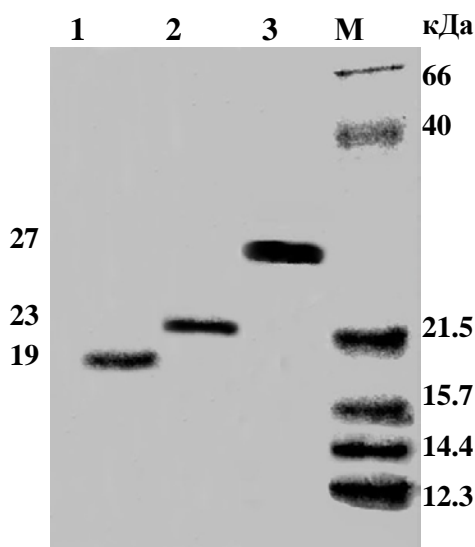


Рисунок 5. Электрофореграмма протеиназ *B. pumilus* в денатурирующих условиях: 1 – металлоэндопептидаза (19 кДа), 2 – глутамилэндопептидаза (23 кДа), 3 – субтилизиноподобная протеиназа (27 кДа). М – Маркеры: РНКаза (Биназа) (12.3 кДа), лизоцим (14.4 кДа), РНКаза А (15.7 кДа), ингибитор трипсина (21.5 кДа), пероксидаза (40 кДа), БСА (66 кДа).

Таким образом, нами проведена эффективная очистка протеиназ *B. pumilus* 7P из рекомбинантных штаммов с помощью аффинной хроматографии.

2. Фибринолитическая активность протеиназ. Изучали действие бактериальных протеиназ по отношению к плазминогену, а также фибринолитические свойства этих ферментов. Установлено, что протеиназы не обладали активаторной способностью по отношению к плазминогену, в отличие от стрептокиназы, белка микроорганизмов, который успешно применяется в медицинской практике, как активатор плазминогена.

Для определения фибринолитической активности протеиназ оценивали зоны лизиса фибрина при нанесении проб на прогретые и непрогретые фибриновые пластины. После инкубации при 37°C в течение 24 ч инкубации с субтилизиноподобной протеиназой площадь зон лизиса фибрина на обеих пластинах составила $67 \pm 3.8 \text{ мм}^2$ и $69 \pm 2.4 \text{ мм}^2$, соответственно (Рисунок 6),. Статистически достоверной разницы между площадями не обнаружено. Для глутамилэндопептидазы *B. pumilus*, узкоспецифичного фермента, для зон лизиса фибрина на обеих чашках также не наблюдали разницы площадей. Таким образом, сериновые протеиназы *B. pumilus* обладали фибринолитической активностью и не способны активировать плазминоген.

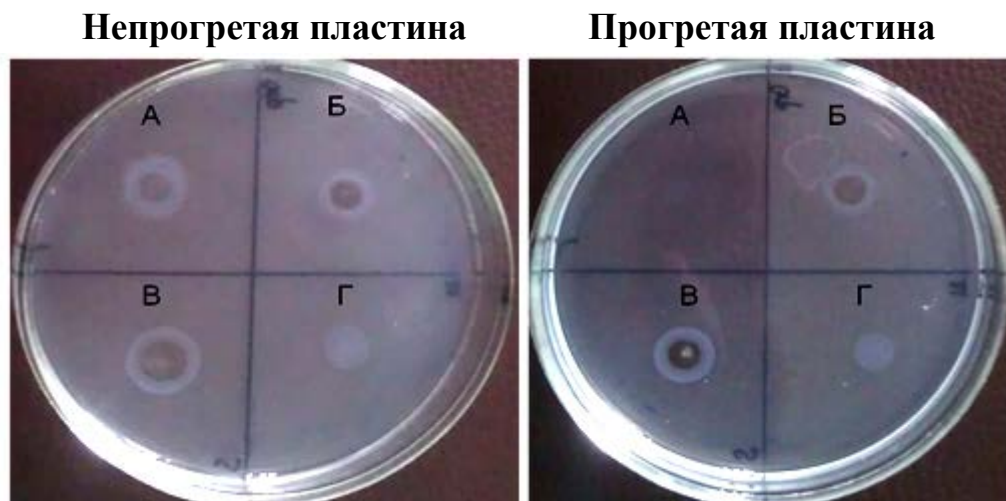


Рисунок 6. Фибринолитическая активность ферментов; А – стрептокиназа, Б – глутамилэндопептидаза, В – субтилизиноподобная протеиназа, Г – металлопротеиназа.

Металлопротеиназа *B. pumilus* 7P не проявляла активности по отношению к фибрину и плазминогену, хотя и является ферментом с широкой специфичностью. При инкубации фибриновых пластин с металлопротеиназой зоны гидролиза фибрина не формировались. По данным литературы металлопротеиназы, секретируемые *B. subtilis* A1 и *B. amyloliquefaciens* CB1,

обладали фибринолитическими свойствами (Yeo et al., 2011, Neo et al., 2013). Другие бациллярные ферменты также расщепляли фибрин. Так, субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза бактерий *B.amyloliquefaciens* Н2 в концентрации 0.25 мг/мл обладали высокой фибринолитической активностью и активаторной способностью по отношению к плазминогену (Маликова, 2007).

Анализировали продукты гидролиза фибриногена протеиназами *B. pumilus* (Рисунок 7). Продукты гидролиза разделяли на электрофорезе и идентифицировали с помощью MALDI масс-спектрометрии. Анализ гидролизатов показал, что фибриноген в результате электрофореза в денатурирующих условиях без добавления к нему ферментов (дорожка 2) диссоциировал на три цепи - альфа, бета и гамма, соответствующие полосам с молекулярными массами 53, 58 и 67 кДа, соответственно.

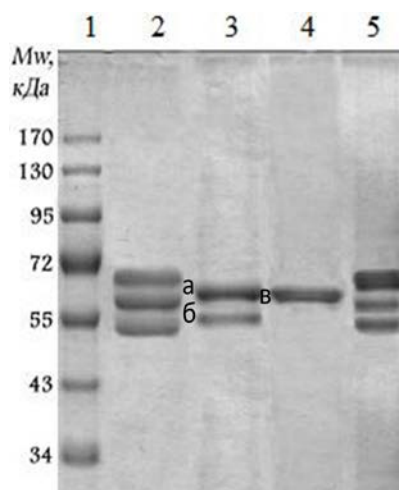


Рисунок 7. Электрофореграмма продуктов гидролиза бычьего фибриногена бактериальными протеиназами. 1 – маркеры; 2 – фибриноген без добавления ферментов; 3 – в присутствии глутамилэндопептидазы; 4 – в присутствии субтилизиноподобной протеиназы; 5 – в присутствии металлопротеиназы. Полосы *a* и *v* – альфа-цепи фибриногена, полоса *б* – бета-цепь фибриногена.

Субтилизиноподобная протеиназа расщепила бета и гамма цепи фибриногена, поскольку обнаружили фрагменты только альфа-цепи (Рисунок 22 дорожка 4, полоса *в*) (Таблица 2). Глутамилэндопептидаза гидролизовала гамма-цепь, но не расщепляла альфа- и бета-цепи фибриногена (Рисунок 22 дорожка 3, полосы *a*, *б*). Металлопротеиназа была неактивной по отношению ко всем структурным компонентам фибриногена. По данным на рисунке 22 (дорожка 5), видно, что полосы альфа-, бета- и гамма-цепей фибриногена соответствуют таковым в контроле.

Таблица 2. MALDY-TOF анализ пептидов, полученных из полос электрофореграммы рисунка 7 (<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>).

Полоса (рис. 7)	<i>m/z</i> триптических пептидов	Расположение пептида/цепь	Аминокислотная последовательность
<i>а</i>	1155,85	146-154/ α	KVIEKVQHI
	1283,96	91-100/ α	LRDSLFFNYQK
	1495,21	75-87/ α	GLIDEVDQDFTSR
	1754,42	73-87/ α	MKGLIDEVDQDFTSR
<i>б</i>	1476,20	344-355/ β	KYQISVNKYRGT
	1718,78	129-143/ β	KDLWQKRQKQVKDNE
	2384,74	463-482/ β	VCDNIFVHYVIGIFFHTLYS
<i>в</i>	1155, 92	146-154/ α	KVIEKVQHI
	1495,21	75-87/ α	GLIDEVDQDFTSR
	1753,96	73-87/ α	MKGLIDEVDQDFTSR
	2593, 88	544-568/ α	VSETESRGSESGIFTNTKESSSHNP


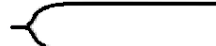



В таблице 2 приведены результаты анализа масс-спектров триптических пептидов, полученных из полос, представленных на электрофореграмме (рисунок 7). Обнаруженные массы 1155.85, 1283.96; 1495.21; 1753.96; 1754.42; 2593.88 идентифицированы как пептиды, относящиеся к альфа-цепи, а массы 1476.20; 1718.78; 2384.74 – как пептиды бета-цепи фибриногена. С помощью программы PeptideMass (<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>) были получены аминокислотные последовательности пептидов, соответствующие их массам.

Таким образом, субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза *B. pumilus* 7P, являются потенциальными фибринолитическими агентами, действующие на фибриноген и не активирующие плазминоген, что минимизирует побочные эффекты.

3. Тромболитические и антикоагулянтные свойства протеиназ *B.pumilus*. Способность фермента разрушать фибриноген не всегда отражает его способность лизировать тромб, поскольку в плазме крови могут содержаться ингибиторы протеиназ. Исследовали способность протеиназ *B.pumilus* лизировать преобразованный тромб (тромболитическую активность) и препятствовать формированию тромба (антикоагулянтную активность). Установлено, что бактериальные протеиназы обладали дозозависимой тромболитической активностью. Наибольшей активностью обладала субтилизиноподобная протеиназа в концентрации 0.4 мг/мл: лизис тромба происходил в течение 125 мин. В концентрации 0.2 мг/мл субтилизиноподобная протеиназа лизировала тромб за 185 мин. Глутамилэндопептидаза в концентрациях 0.2 и 0.4 мг/мл лизировала тромб за 270 и 225 мин, соответственно. Металлопротеиназа не проявила тромболитических свойств.

По данным литературы бациллопептидаза F, секретируемая *B. licheniformis* KJ-31 в концентрации 0.5 мг/мл эффективно лизировала тромб в течение 60 мин. (Hwang et al., 2007). Описана сериновая фибринолитическая протеиназа, секретируемая суперпродуцентом *B. subtilis* LD-8547, способная растворить фибриновый сгусток за 30 мин в концентрации 20 мг/мл (Wang et al., 2008). Способность протеиназ *B. pumilus* лизировать тромб даже в низкой концентрации 0.2 мг/мл, важна с точки зрения минимизации побочных токсических эффектов. Более того, субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза *B. pumilus* 7P обладали выраженными антикоагулянтными свойствами. Металлопротеиназа этих бактерий не оказывала влияния на процесс тромбообразования (Рисунок 8). Тромбоэластограммы г-ж указывали на гиперфибринолиз под действием сериновых протеиназ. При первичном фибринолизе уровень фибриногена снижался при расщеплении его плазмином (Рисунок 8г, таблица 3).

Таблица 3. Типичные тромбоэластограммы. (Стандарты сравнения)

Норма	
Гиперкоагуляция	
Гипокоагуляция	
Первичный фибринолиз	
Вторичный фибринолиз	

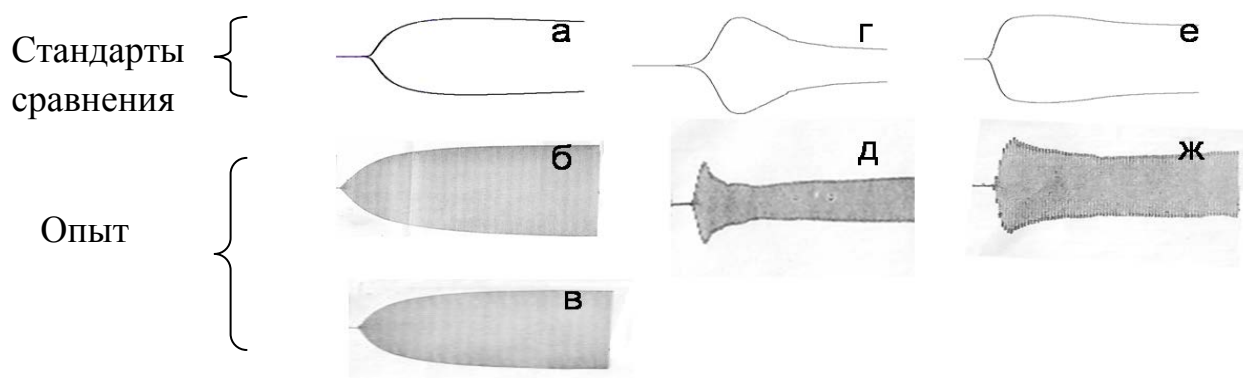


Рисунок 8. Тромбоэластограммы плазмы крови человека после инкубации с протеиназами. а – норма, б – контроль (без добавления ферментов), в – металлопротеиназа, г – первичный фибринолиз, д – глутамилэндопептидаза, е – вторичный фибринолиз, ж – субтилизиноподобная протеиназа.

Исходя из стандартов сравнения заключили, что глутамилэндопептидаза расщепляла фибриноген по принципу пламина (Рисунок 8д). При вторичном фибринолизе (Рисунок 8е), появление большого количества продуктов деградации фибрина активирует плазминую систему крови. По-видимому, под действием субтилизиноподобной протеиназы происходило интенсивное расщепление фибриногена, вследствие чего активировалась плазминовая система. Это подтверждалось тромбоэластограммой, которая, исходя из стандартов сравнения, соответствует вторичному фибринолизу (Рисунок 8ж).

4. Действие бациллярных протеиназ на матриксные металлопротеиназы-9 (ММП-9) разных клеточных линий

Исследования последних лет показывают широкий интерес к изучению активности матриксных металлопротеиназ-9 (ММП-9) в плазме крови при сердечнососудистой патологии (Mohammed et al., 2003). По современным представлениям ММП-9 оказывает влияние на процессы разрушения внеклеточного матрикса, повреждение эндотелия и «дестабилизацию» атеросклеротической бляшки. Механизм деструкции атеросклеротической бляшки характеризуется локальным воспалением с высокой активностью матриксных металлопротеиназ (ММП), воздействующих на коллагеновые волокна «покрышки», тем самым способствуя её ослаблению, дестабилизации и как следствие разрыву (Cleutjens et al., 1994). По мнению ряда авторов, именно ММП-9 выполняет ключевую роль в дестабилизации бляшки и в развитии острого коронарного синдрома (Galis et al., 1994).

Исследовали активность бациллярных протеиназ в концентрации 0.2 мг/мл по отношению к ММП-9 кондиционных сред фибробластов мыши (3T3Balb SV40), мезенхимных клеток (МСК) и клеток Hela-M с помощью зимографии (Рисунок 9). Контролем служила кондиционная среда культуры клеток без добавления протеиназ.

При обработке кондиционных сред клеточных линий субтилизиноподобной протеиназой и металлопротеиназой формировались зоны гидролиза желатина, соответствующие активности ММП-9 исследуемых культур. По-видимому, после обработки субтилизиноподобной протеиназой и металлопротеиназой кондиционных сред, ММП-9 в них оставалась активной.

На зимограмме видно, что для кондиционных сред всех клеточных линий, обработанных глутамилэндопептидазой, отсутствовали зоны гидролиза желатина ММП-9. Полученные данные свидетельствовали, что бактериальная глутамилэндопептидаза расщепляла ММП-9, вследствие чего желатиназа теряла способность к гидролизу желатина.



Рисунок 9. Действие ферментов на кондиционные среды разных клеточных линий. К – Контроль, кондиционная среда без добавления ферментов; Г – Глутамилэндопептидаза; С – Субтилизиноподобная протеиназа; М – Металлопротеиназа.

Протеиназа MMP-9 состоит из N- и С-концевых доменов. N- Концевой каталитический домен содержит консервативную аминокислотную последовательность **HEXXHXXGXXH**, ответственную за каталитическую активность фермента. Этот участок активного центра фермента содержит остаток глутаминовой кислоты (E), участвующий в катализе (Соловьева, 1994; Балабан с соавт., 2012, 2013). По-видимому, глутамилэндопептидаза, которая гидролизует связи, образованные глутаминовой и аспарагиновой кислотами, может гидролизовать пептидную связь по остатку глутаминовой кислоты в активном центре ММП-9 (Балабан с соавт., 2013).

Таким образом, полученные нами данные в отношении глутамилэндопептидазы *B. pumilus* 7P можно рассматривать как фактор снижения уровня активности матриксных протеиназ ММП-9, а значит, как перспективный препарат для борьбы с сердечнососудистыми заболеваниями.

5. Гидролиз β -амилоидного пептида протеиназами *B. pumilus*.

Формирование тромбов в сосудах при болезни Альцгеймера связывают с агрегацией β -амилоидного пептида (β A). Агрегационные свойства β A обусловлены его микроокружением, избыточной локальной концентрацией и присутствием специфических аминокислотных последовательностей в первичной структуре. Так, последовательность Glu11-His14 в β A контролирует инициацию

димеризации и начало агрегации с образованием бляшки (Esteras-Choro et al., 2005):

{ASP}{ALA}{GLU}{PHE}{ARG}{HIS}{ASP}{SER}{GLY}{TYR}{**GLU**}{**VAL**}{**HIS**}{**HIS**}{GLN}{LYS}{LEU}{VAL}{PHE}{PHE}{ALA}{GLU}{ASP}{VAL}{GLY}{SER}{ASN}{LYS}{GLY}{ALA}{ILE}{ILE}{GLY}{LEU}{MET}{VAL}{GLY}{GLY}{VAL}{VAL}{ILE}{ALA}

Известно, что ионы цинка индуцируют димеризацию металл связывающего домена (первые шестнадцать аминокислотных остатков – Asp1-Lys16), а участок Glu11-His14 контролирует этот процесс (Bush et al., 1994). В связи с этим, участок Glu11-His14 можно рассматривать как мишень, блокирование которой будет предотвращать процесс димеризации β -амилоида и развитие болезни Альцгеймера.

Изучали расщепление β -амилоидного пептида (42 аминокислотных остатков) протеиназами *B. pumilus* 7P с целью получения непатогенной формы пептида, неспособного к образованию бляшек. Глутамилэндопептидаза расщепляла связи, образованные остатками глутаминовой и аспарагиновой аминокислот: Asp1-Ala2, Glu3-Phe4, Asp7-Ser8, Glu22-Asp23, Asp23-Val24, а также дипептидную связь Glu11-Val12 в металл связывающем участке Glu11-His14. (Рисунок 10 А).

Субтилизиноподобная протеиназа гидролизовала пептидные связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислот (Рисунок 10 Б). Однако фермент не расщеплял связи в пептиде Glu11-His14. Металлопротеиназа гидролизовала пептид Glu11-His14 в трех позициях: Glu11-Val12, Val12-His13, His13-His14 (Рисунок 10 В).

Таким образом, протеиназы гидролизовали бета-амилоид, но наиболее перспективными являются глутамилэндопептидаза и металлопротеиназа, способные инактивировать сайт инициации димеризации бета-амилоида Glu11-His14.

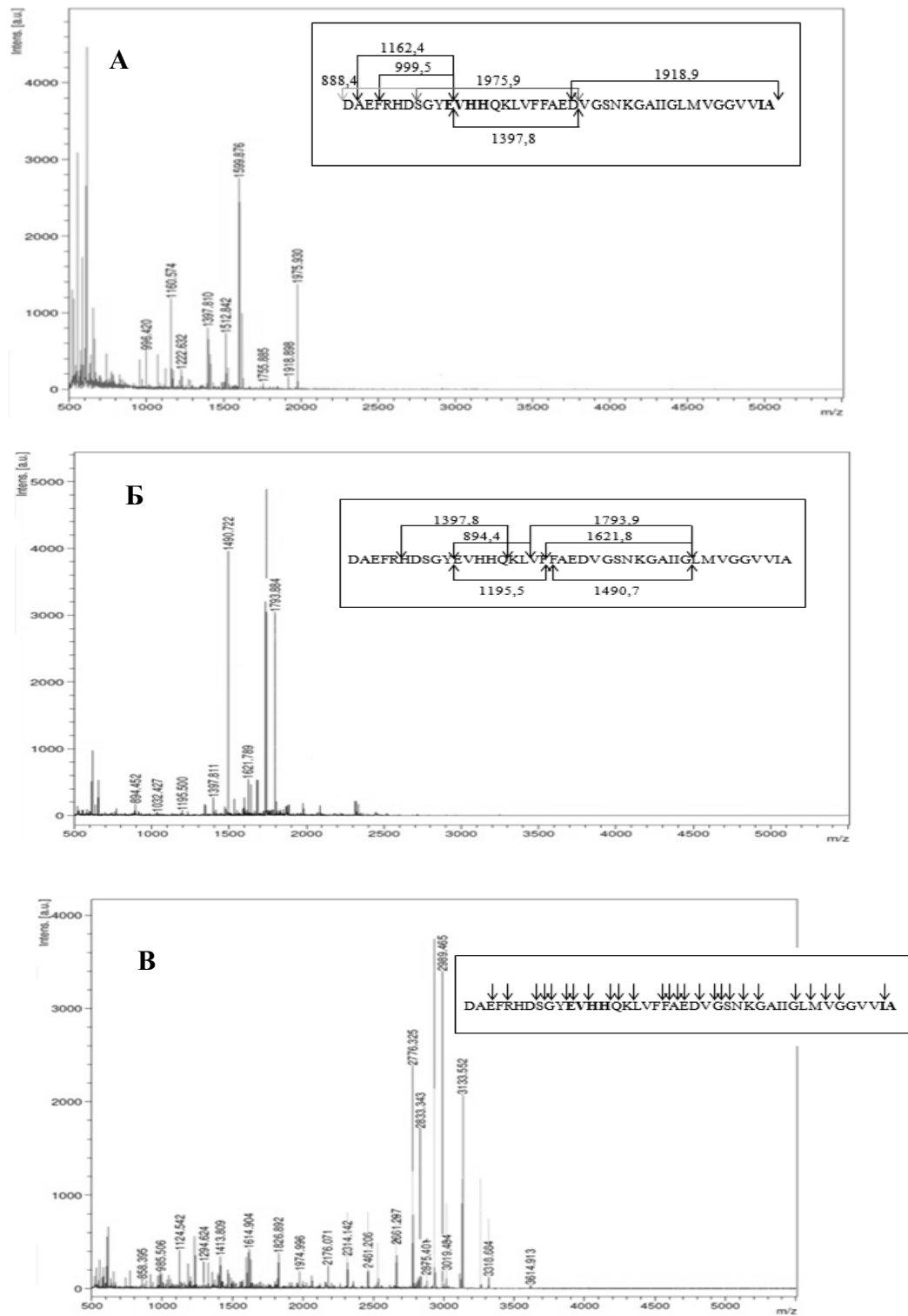


Рисунок 10. Продукты гидролиза β -амилоидного пептида 1-42 протеиназами *B. pumilus*: А – глутамилэндопептидазой; Б – субтилизиноподобной протеиназой; В – металлопротеиназой.

6. Влияние протеиназ *B. pumilus* на инфицирование клеток аденовирусами. Исследовали влияние протеиназ *B. pumilus* на инфицирующую способность аденовируса в отношении культуры клеток человека НЕК293А. Обработывали аденовирус в концентрациях 10^3 и 10^4 БОЕ/мкл каждой из

протеиназ в концентрации 0.1, 0.2 и 0.4 мг/мл. Инкубация аденовируса с протеиназами длилась в течение одного часа. Инфицирование культуры клеток человека НЕК293А проводили путем добавления смеси аденовируса с протеиназой к клеткам. Идентификацию инфицированных клеток НЕК293А, содержащих рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP проводили с помощью флуоресцентной микроскопии (Рисунок 11 Е, Ж).

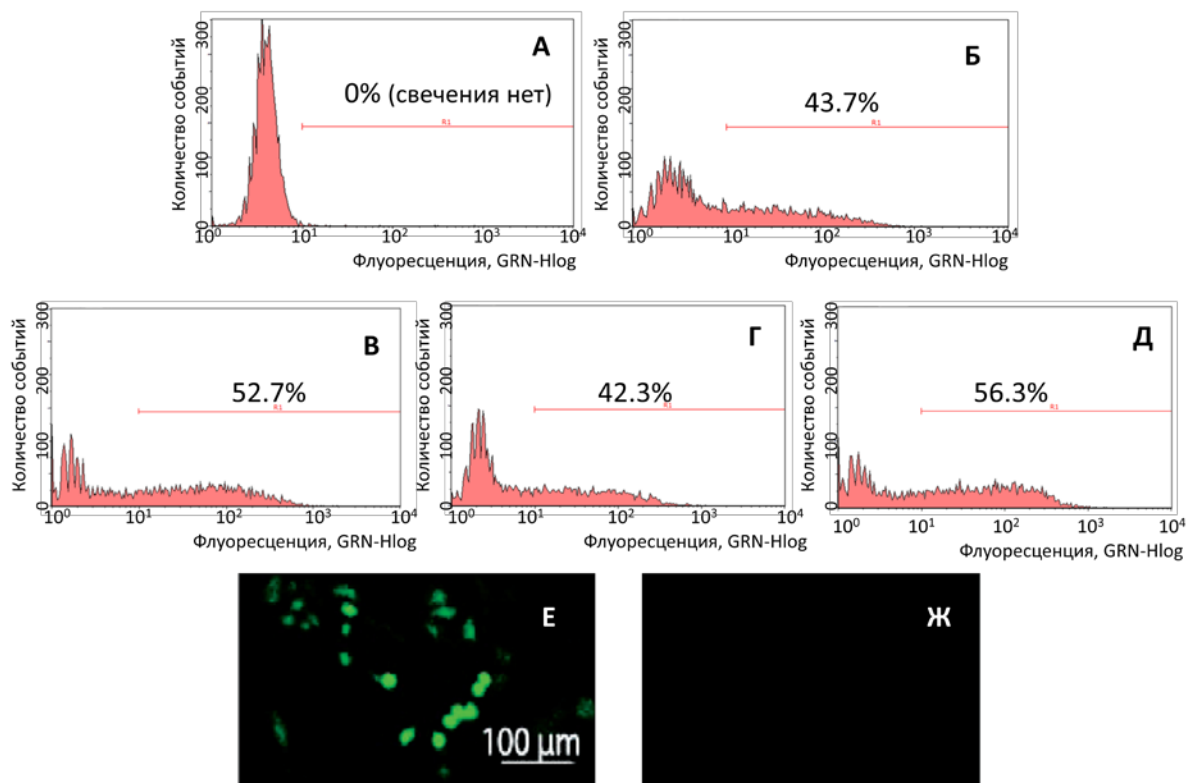


Рисунок 11. Культура клеток НЕК293А, инфицированная аденовирусом в концентрации 10^3 БОЕ/мкл после обработки его протеиназами (конц. 0.4 мг/мл): А – контроль без вируса (свечения нет); Б – рекомбинантный аденовирус Ad-EGFP в концентрации 10^3 БОЕ/мкл (свечение 43.7%); В – обработка металлопротеиназой (свечение 52.7%); Г – обработка глутамилэндопептидазой (свечение 42.3%); Д – обработка субтилизиноподобной протеиназой (свечение 56.3%); Е – инфицированные рекомбинантным вирусом клетки, свечение EGFP; Ж – контрольные клетки, не инфицированные вирусом. А-Д – проточная цитометрия; Е, Ж – флуоресцентная микроскопия. Шкала: 100 мкм

Максимальное количество инфицированных EGFP-позитивных клеток наблюдали в неразведенном образце.

Интенсивное свечение, сравнимое с положительным контролем (Рисунок 11 Е), наблюдали в лунках, соответствующих присутствию протеиназ и рекомбинантного аденовируса Ad-EGFP в концентрации 10^4 БОЕ/мкл. Кроме того, EGFP-позитивные клетки наблюдали при использовании рекомбинантных аденовирусов Ad-EGFP в концентрации 10^3 БОЕ/мкл, обработанных

бактериальными ферментами (Рисунок 11 В, Г, Д). Бактериальные протеиназы не оказывали ингибирующего действия на процесс инфицирования, на их фоне происходила эффективная трансдукция клеток рекомбинантным вирусом.

Таким образом, бактериальные ферменты не снижали инфицирующую способность аденовируса, о чем свидетельствовала эффективная трансдукция вирионов в клетки-хозяева. Оболочечный белок аденовирусов являлся устойчивым к действию бактериальных протеиназ с различной специфичностью.

7. Исследование цитотоксичности протеиназ по отношению к клеткам эукариот. Одним из требований к потенциальным лекарственным препаратам является отсутствие токсичности по отношению к культурам клеток млекопитающих. Исследовали действие бациллярных протеиназ на клеточные культуры животных: эпителиальные (ЛЭК (легкие эмбриона коровы), Vero (почки африканской зеленой мартышки), РК-15 (почки свиньи)) и онкотрансформированные (НГУК (невринома Гассерова узла крысы)).

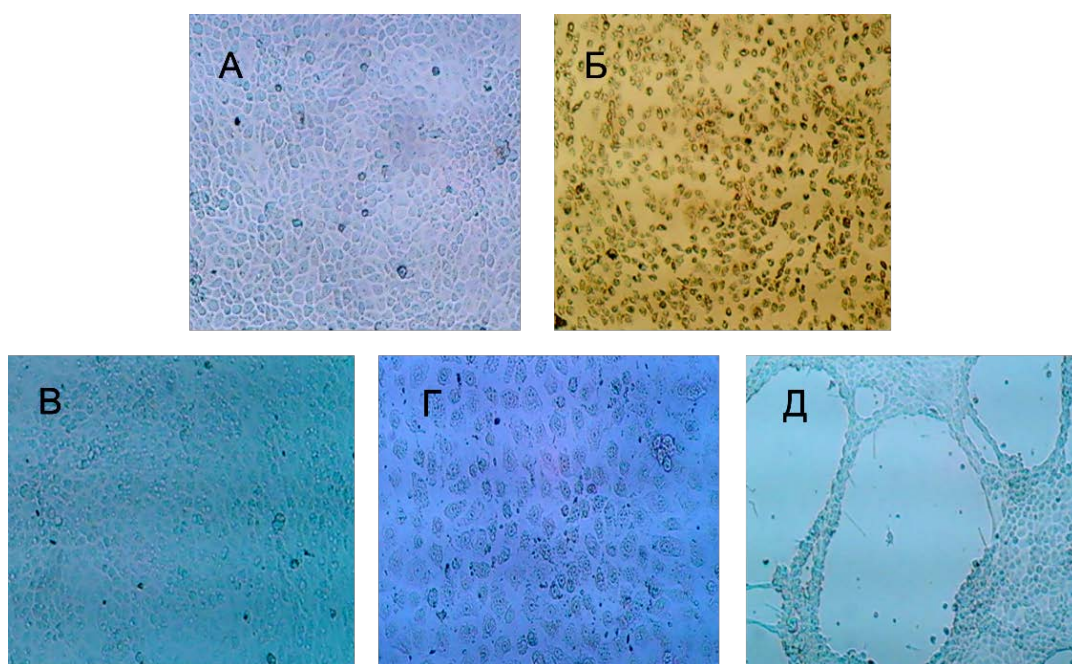


Рисунок 12. Действие ферментов (в концентрации 200 мкг/мл) на перевиваемую линию клеток легких эмбриона коровы (ЛЭК) после 24 ч инкубации. А – Контроль, Б – стрептокиназа (100 мкг/мл), В– глутамилэндопептидаза, Г – металлопротеиназа, Д – субтилизиноподобная протеиназа.

При наблюдении за изменениями морфологии клеток ЛЭК, Vero, РК-15, НГУК и клеточного монослоя линий клеток животных установили, что бациллярные протеиназы способны оказывать цитотоксический дозозависимый эффект. При внесении протеиназ в концентрациях 0.2 и 0.4 мг/мл происходило

округление клеток и вакуолизация цитоплазмы всех исследуемых клеточных линий. Наибольшей чувствительностью к действию протеолитических ферментов *B. pumilus* 7P обладали перевиваемые культуры клеток ЛЭК и Vero (Рисунок 12). Наименее токсичными бактериальными протеиназами оказались по отношению к линиям НГУК и РК-15. Среди протеиназ наиболее токсичной оказалась субтилизиноподобная протеиназа, в ее присутствии монослой клеточных линий Vero и РК-15 полностью разрушался при всех исследуемых концентрациях фермента.

Описаны цитопатические эффекты протеолитических ферментов патогенов, в частности протеаз, играющих большую роль в патогенезе этих бактерий (Shinoda et al., 2011). Так, в результате действия протеаз *Vibrio cholerae* не происходило образования компактного монослоя клеток HeLa и фибробластов L-929. На поверхности клеток появлялись многочисленные пузырьки, происходила вакуолизация цитоплазмы, набухание митохондрий и увеличение количества лизосом (Саямов с соавт., 2011).

Металлопротеаза другого патогенна *Enterobacter sakazakii* вызывала округление клеток СНО (культура клеток яичника китайского хомяка), способствуя, таким образом, патогенезу бактерии (Kothary et al., 2007). Цитопатический эффект кошачьего патогена *Tritrichomonas foetus* на эпителиальные клетки кишечника IPEC-J2 был вызван цистеиновой протеазой (Tolbert et al., 2014).

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью количественного МТТ-теста. Он основан на восстановлении митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток конвертировать водорастворимый 3-(4.5-диметилтиазол-2-ил)-2.5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который кристаллизуется внутри клетки (Riss et al., 2013). Количество формазана измеряли спектрофотометрически. Последующее растворение формазана в органических растворителях и фотометрия позволили сопоставить изменение оптической плотности раствора по отношению к контролю с изменением количества жизнеспособных клеток, а в цитотоксических исследованиях оценить специфическую гибель клеток, индуцированную цитотоксическим агентом.

Показано, что при внесении глутамилэндопептидазы в концентрациях 0.01-0.4 мг/мл жизнеспособность клеток составляла более 80% для каждой линии (Рисунок 13). Под действием субтилизиноподобной протеиназы и металлопротеиназы в концентрациях 0.01-0.4 мг/мл жизнеспособность клеток составляла не более 70%.

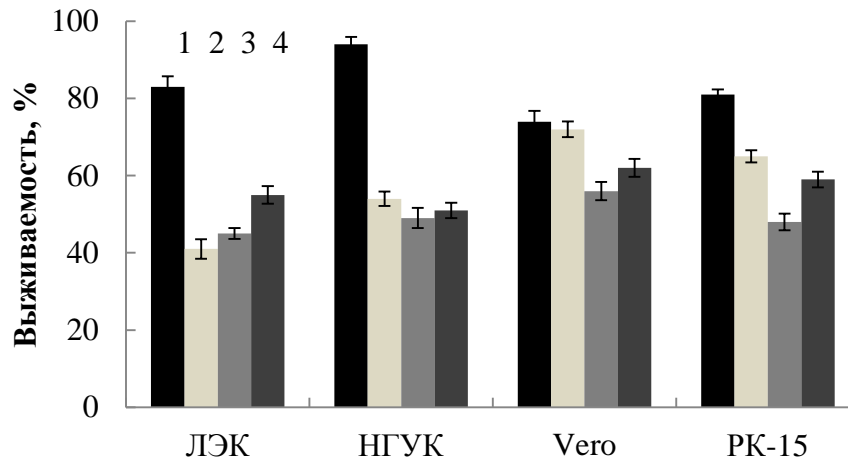


Рисунок 13. Жизнеспособность клеток через 24 ч инкубации с ферментами в концентрации 0.2 мг/мл. 1 – глютамилэндопептидаза, 2 – субтилизиноподобная протеиназа, 3 – металлопротеиназа, 4 – стрептокиназа. За 100% принята жизнеспособность клеток без обработки их протеиназами.

Параллельно проводили тестирование стрептокиназы, которая применяется в медицинской практике как тромболитик. Стрептокиназа способна оказывать токсические эффекты на перевиваемые линии клеток животных. Целостность монослоя нарушалась при добавлении стрептокиназы в концентрации 0,1 мг/мл (Рисунок 12). Жизнеспособность клеток всех линий падала более чем на 40% в присутствии 0.1 мг/мл стрептокиназы и составляла около 60% (Рисунок 13).

Таким образом, наименее токсичной к клеточным культурам оказалась глютамилэндопептидаза, в концентрациях менее 0.2 мг/мл изменений клеточного монослоя не наблюдали, жизнеспособность клеток при этом оставалась более 80%. Наличие тромболитической и антикоагулянтной активности в нетоксичной концентрации, а также способность к расщеплению ММП-9 и бета-амилоидного пептида свидетельствуют о том, что глютамилэндопептидазу можно рассматривать в качестве потенциального фермента для создания лекарственных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, мы исследовали тромболитические, фибринолитические и антикоагулянтные свойства бактериальных протеиназ, определили способность этих ферментов к гидролизу матриксной металлопротеиназы-9 и бета-амилоида, изучили влияние на инфицирующую способность аденовируса. Установлено, что сериновые протеиназы обладают фибринолитической, тромболитической и антикоагулянтной активностью, тогда как металлопротеиназа не способна расщеплять кровяные сгустки. Сериновые протеиназы в отличие от

стрептокиназы гидролизovali фибриноген и не расщепляли плазминоген. Глутамилэндопептидаза способна инактивировать ММП-9 в отличие от субтилизиноподобной протеиназы и металлопротеиназы. Все бактериальные ферменты несмотря на различную специфичность не способны подавлять инфицирующую способность аденовируса. Установлено, что бактериальные протеиназы проявляют дозозависимый цитотоксический эффект.

ВЫВОДЫ:

1. Получены гомогенные препараты глутамилэндопептидазы, субтилизиноподобной протеиназы и металлопротеиназы *B. pumilus* на основе вектора экспрессии с гетерологичным конститутивным промотором, что привело к увеличению выхода ферментов в 1,5-2 раза по сравнению с рекомбинантными штаммами, содержащими гены протеиназ под собственными промоторами.

2. Глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* обладают тромболитической и фибринолитической активностью. Металлопротеиназа не способна расщеплять тромбы *in vitro* и влиять на процесс тромбообразования.

3. Глутамилэндопептидаза расщепляет матриксную металлопротеиназу-9. Субтилизиноподобная протеиназа и металлоэндопроtease не активны по отношению к ММП-9.

4. Бактериальные протеиназы гидролизуют бета-амилоид. Глутамилэндопептидаза и металлопротеиназа, в отличие от субтилизиноподобной протеиназы, расщепляют его в сайте инициации димеризации Glu11-His14.

5. Рекомбинантный аденовирус, после обработки бактериальными протеиназами сохранял способность инфицировать *in vitro* культуры клеток человека.

6. Бактериальные протеиназы в концентрации 200-400 мкг/мл способны оказывать цитотоксическое действие на перевиваемые линии клеток животных.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Данилова Ю.В., Кириллова Ю.М., Рудакова Н.Л., Богомольная Л.М., Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Действие метцинкиновой металлопротеиназы бацилл на перевиваемые культуры клеток животных. Гены & Клетки. 2014. Т. 9, №1, С. 72-76. – (перечень ВАК), автора – 0.05 пл.
2. Балабан Н. П., Данилова Ю. В., Шамсутдинов Т. Р., Марданова А. М., Черемин А. М., Руденская Г. Н., Шарипова М. Р. Свойства глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus* на разных фазах роста рекомбинантного штамма // Биоорганическая химия. – 2013. Т. 39. – № 1. – С. 46–54. – (перечень ВАК), автора – 0.08 пл.

3. Сулейманова А. Д., **Данилова Ю. В.**, Грайнер Р., Шарипова М. Р. Новая бактериальная внутриклеточная фитаза энтеробактерий: выделение и характеристика // Биоорганическая химия. – 2013. – Т. 39. – № 4. – С. 424-429. – (перечень ВАК), автора – 0.08 пл.
4. **Данилова Ю.В.**, Черемин А.М., Замалеева А.И., Марданова А.М., Замалютдинова Н.М., Шарипова М.Р. Тромболитическая и фибринолитическая активность бактериальных протеаз // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. – № 3. – С. 49-51. – (перечень ВАК), автора – 0.03 пл.
5. **Данилова Ю.В.**, Балабан Н.П., Шамсутдинов Т.Р., Шарипова М.Р. Сравнительная характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста // Ученые записки Казанского университета. – 2012. – Т.154. – № 2. – С. 55-65. – (перечень ВАК), автора – 0.172 пл.
6. Мартынова Е.В., **Данилова Ю.В.**, Анохин В.А., Ризванов А.А., Шарипова М.Р. Биобезопасная модель аденовирусной инфекции: влияние бактериальных протеаз на инфицирование клеток человека *in vitro* // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. – № 3. – С. 105-107. – (перечень ВАК), автора – 0.04 пл.
7. Кириллова Ю.М., **Данилова Ю.В.**, Шарипова М.Р. Действие бактериальных сериновых протениназ на перевиваемые культуры клеток животных // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. – № 3. – С. 88-91. – (перечень ВАК), автора – 0.08 пл.
8. **Данилова Ю.В.**, Балабан Н.П., Шамсутдинов Т.Р., Марданова Т.Р., Шарипова М.Р. Среда для культивирования рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* с модифицированным геном глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2011. – Т. 153. – № 2. – С. 51-62. – (перечень ВАК), автора – 0.15 пл.
9. Рудакова Н.Л., Балабан Н.П., **Данилова Ю.В.**, Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Характеристика цинкзависимой эндопептидазы *Bacillus intermedius* // Биохимия. – 2010. – Т. 75. – № 10. – С.1462-1470. – (перечень ВАК), автора – 0.113 пл.
10. Шамсутдинов Т.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., **Данилова Ю.В.**, Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста // Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34. – № 3. – С. 322-326. – (перечень ВАК), автора – 0.05 пл.
11. Toymentseva A. Anna. A novel LIKE expression system for production of applied *Bacillus* proteolytic enzyme sprint / Toymentseva A. Anna., **Danilova V. Iuliia**, Thorsten Mascher, Sharipova R. Margarita. // Abstract of the 38th Federation of European Biochemical Societies Congress "Mechanisms in Biology". St. Petersburg, Russia: 2013.
12. Балабан Н.П. Характеристика металлопротеиназы *Bacillus pumilus* из клана метцинкинов / Балабан Н.П., Рудакова Н.Л., **Данилова Ю.В.**, Шарипова М.Р. // Материалы 7-ой Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция». Петрозаводск. 2014. – Стр. 83.
13. **Данилова Ю.В.** Действие бациллярных ферментов на матриксные металлопротеиназы (ММР-9) разных клеточных линий / Данилова Ю.В., Балабан Н.П., Шарипова М.Р. // Материалы 7-ой Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция». Петрозаводск. 2014. – Стр. 99.
14. **Данилова Ю.В.** Потенциальные тромболитические препараты на основе сериновых протеиназ / Ю.В. Данилова, М.Р. Шарипова // Материалы VI Российского симпозиума «Белки и пептиды». Уфа: 2013. – С. 262.

15. Сулейманова А.Д. Новая внутриклеточная фитаза энтеробактерий: выделение и характеристика / А.Д. Сулейманова, **Ю.В. Данилова**, Р. Грайнер, М.Р. Шарипова // Материалы VI Российского симпозиума «Белки и пептиды». Уфа: 2013. – С. 278.
16. **Данилова Ю.В.** Потенциальные тромболитические препараты на основе сериновых протеиназ / Ю.В. Данилова // Материалы XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013». Москва: 2013. – С. 192.
17. **Данилова Ю.В.** Тромболитическая и антикоагулянтная активность сериновых протеиназ / Ю.В. Данилова // Материалы 86-ой Всероссийской студенческой научной конференции, памяти чл.-корр. Академии наук РТ, проф. И.Г. Салихова. Казань: 2012. – С. 232.
18. **Данилова Ю.В.** Тромболитические и антикоагулянтные свойства сериновых протеиназ бацилл / Ю.В. Данилова, М.Р. Шарипова // Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века». Москва: 2012. – С. 218.
19. **Данилова Ю.В.** Протеиназы бацилл как перспективные тромболитические препараты / Ю.В. Данилова, Н.Л. Рудакова, М.Р. Шарипова // Материалы X Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КФУ «Материалы и технологии XXI века». Казань: 2011. – С.40.
20. **Данилова Ю.В.** Протеиназы бацилл как перспективные тромболитические препараты / Ю.В. Данилова, Н.Л. Рудакова, М.Р. Шарипова // Материалы XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2011». Москва: 2011 г. – С. 162.
21. Балабан Н.П. Получение и свойства адамализиноподобной металлопротеиназы *Bacillus pumilus* 3-19 / Н.П. Балабан, Н.Л. Рудакова, **Ю.В. Данилова**, М.Р. Шарипова // Материалы V Российского симпозиума «Белки и пептиды» Петрозаводск: 2011. – Стр. 236.
22. **Данилова Ю.В.** Тромболитические и антикоагулянтные свойства протеиназ у бацилл / Ю.В. Данилова, Н.Л. Рудакова, А.Р. Сабирова, М.Р. Шарипова // Материалы XLVIII международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс". Новосибирск: 2010. – С. 166.
23. **Данилова Ю.В.** Биологические эффекты бактериальных протеиназ / Ю.В. Данилова, Н.Л. Рудакова, А.Р. Сабирова, М.Р. Шарипова // Материалы Международного молодежного научного форума "Ломоносов-2010". Москва: 2010. – С. 165.
24. Сабирова А.Р. Металлопротеиназа *Bacillus intermedius* / А.Р. Сабирова, Н.Л. Рудакова, **Ю.В. Данилова**, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы Первой Всероссийской молодежной научной конференции, посвященной 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете. Тезисы докладов «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии». Томск: 2010г. – С. 138-139.
25. Сабирова А.Р. Металлопротеиназа *Bacillus intermedius* / А.Р. Сабирова, Н.Л. Рудакова, **Ю.В. Данилова**, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы Первой Всероссийской молодежной научной конференции, посвященной 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете. Труды Томского Государственного Университета «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии». Томск: 2010г. – С. 396-398.
26. **Данилова Ю.В.** Тромболитические и антикоагулянтные свойства протеиназ у бацилл / Ю.В. Данилова, Н.Л. Рудакова, Е.О. Михайлова, Л.А. Маликова, М.Р. Шарипова // Материалы научно-практической конференции «Становление и достижения биохимической школы Казанского университета». Казань: 2009. – С. 42.

Е-mail автора: Danilova146@mail.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул.Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. Е-mail: ziabramova@mail.ru.